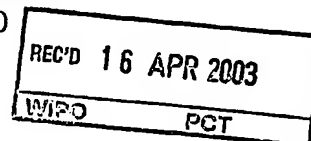




ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

A-1014 WIEN, KOHLMARKT 8 - 10



Kanzleigeühr € 19,00
Schriftengebühr € 78,00

Aktenzeichen A 495/2002

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

**die Firma JSW-Research Forschungslabor GmbH
in A-8020 Graz, Rankengasse 28
(Steiermark),**

am **28. März 2002** eine Patentanmeldung betreffend

"Neurotrophe und neuroprotektive Peptide",

überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung mit der
ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten
Beschreibung übereinstimmt.

Es wurde beantragt, Dr. Manfred Windisch in Graz (Steiermark), als
Erfinder zu nennen.

Österreichisches Patentamt

Wien, am 21. März 2003

Der Präsident:

i. A.



HRNCIR
Fachoberinspektor

PRIORITY

DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



BEST AVAILABLE COPY

REG
PATL
1070 W... gasso 8

010816
Int. Cl.

M157-3000 P AT
B/St

Joppel

A 495 / 2002

AT PATENTSCHRIFT

11 Nr.

73 Patentinhaber: JSW-Research Forschungslabor GmbH
Graz (AT)

Untext

54 Gegenstand: Neurotrophe und neuroprotektive Peptide

61 Zusatz zu Patent Nr.:

62 Ausscheidung aus:

22 21 Angemeldet am: 2002 03 28 ,

33 32 31 Unionspriorität:

42 Beginn der Patentdauer:
Längste mögliche Dauer:

45 Ausgegeben am:

72 Erfinder: Manfred Windisch, Dr.
Graz (AT)

60 Abhängigkeit:

56 Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:

21

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide von 4 bis 14 Aminosäuren Länge. Die erfindungsgemäßen Peptide können als Wirkstoff in Arzneimitteln zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen des Zentralnervensystems, wie dem Morbus Alzheimer, der Lewy Body Demenz, der Parkinson'schen Erkrankung, dem Morbus Huntington (Chorea), der Multisystem-Atrophie und anderen ähnlichen Erkrankungen verwendet werden.

Bei neurodegenerativen Erkrankungen treten im Allgemeinen als gemeinsames Merkmal Aggregate von Proteinen im Gehirn auf. Im Falle der Alzheimer'schen Erkrankung handelt es sich um die sogenannten senilen Plaques (extrazelluläre Eiweißablagerungen, die vornehmlich aus Amyloid-Beta-Peptiden bestehen) und um die sogenannten neurofibrillären Tangles, intrazelluläre Proteinknäuel aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Beim Morbus Parkinson finden sich intrazelluläre Einschlusskörper, bestehend aus aggregiertem Alpha-Synuclein. Nach den neuesten wissenschaftlichen Befunden konnten solche Einschlusskörper (Lewy Bodies) auch bei mehr als 70% der familiären und sporadischen Alzheimer-Erkrankten nachgewiesen werden, man findet sie auch bei Patienten, die am Down-Syndrom leiden. Aggregate von Alpha-Synuclein in Gliazellen treten bei der Multisystem Atrophie auf. Analog dazu finden sich Aggregate vom Prionprotein bei der Creutzfeld-Jakob Erkrankung und verwandten Erkrankungen, und letztendlich Ablagerungen von Huntingtin bei Huntington Chorea.

Bei manchen der Erkrankten liegen mutierte Proteine vor, die ein besonders ausgeprägtes Aggregationsverhalten besitzen. Bei der Mehrzahl der Patienten aber bestehen die Aggregate aus normalen Wildtyp-Proteinen. Es werden verschiedene Ursachen angenommen, die das Löslichkeitsverhalten der Proteine plötzlich verändern, wobei zum Beispiel erhöhter oxidativer Stress während des Alterungsprozesses eine wesentliche Rolle spielen dürfte. Auch Veränderungen in der Kapazität verschiedener proteinabbauender Enzyme kommen als Ursache in Frage, da durch Störungen falsch modifizierte Eiweiße entstehen können, die sich dann ablagern und von verschiedenen Entsorgungsenzymen nicht mehr weiter prozessiert werden können.

Ein anderer auslösender pathophysiologischer Mechanismus besteht in einem gestörten Gleichgewicht zwischen aggregatorischen und anti-aggregatorischen Proteinen. Die Entdeckung, dass das synaptische Protein Alpha-Synuclein den Hauptbestandteil der sogenannten Lewy Bodies darstellt, und dass Mutationen in diesem Protein zu familiärer

Parkinson'scher Erkrankung führen, haben dieses Eiweiß in den Mittelpunkt des Interesses wissenschaftlicher Forschung gerückt. Neben Alpha-Synuclein existieren als weitere Vertreter dieser Proteinfamilie Gamma-Synuclein und Beta-Synuclein, sowie das kürzlich entdeckte Synoretin (Surguchov et al., *Mol. Cell. Neurosci.* 13(2): 95-103 [1999]).

Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen tritt eine Verschiebung des Mengenverhältnisses zwischen den einzelnen Synucleinen dahingehend auf, dass der relative Anteil von Alpha-Synuclein erhöht wird. Es konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass Beta-Synuclein, ein sehr naher Verwandter von Alpha-Synuclein, in der Lage ist, die Aggregation von Alpha-Synuclein dosisabhängig zu hemmen (Hashimoto et al., *Neuron* 32(2): 213-23 [2001]). Versuche in Zellkulturen, bei denen eine Störung der normalen Zellproliferation und Differenzierung durch Überexpression von Alpha-Synuclein ausgelöst wurde, zeigten ebenfalls eine im therapeutischen Sinn günstige Wirkung von Beta-Synuclein, welches das Anhaften, Überleben und Auswachsen von Neuriten in diesen Kulturen wieder normalisierte. Mäuse, die für Alpha-Synuclein transgen sind, zeigen eine erhöhte Produktion dieses Eiweißes und weisen daher ein gestörtes Verhältnis in den Mengen zwischen Alpha- und Beta-Synuclein auf. Sie bilden im Laufe des Alters intraneuronale Einschlusskörper ähnlich den Lewy Bodies aus und zeigen auch fortschreitende motorische Störungen, die mit der Funktionsstörung beim Morbus Parkinson vergleichbar sind. Kreuzt man diese Tiere mit Beta-Synuclein transgenen Tieren, die eine erhöhte Expression dieses Eiweißes zeigen, so lässt sich auf wesentlich höherem Niveau in der Gesamtexpression der Synucleine eine Homöostase wiederherstellen. Als Folge wird die Anzahl der Einschlusskörper hoch signifikant reduziert und der charakteristische neuronale Funktionsverlust komplett verhindert.

Alpha-Synuclein dürfte aber auch eine besonders wichtige Rolle bei der Pathologie der Alzheimer'schen Erkrankung spielen. Dafür spricht die Tatsache, dass ein Teil dieses Proteins, die NACP (Non-Amyloid Component Protein) Domäne, als Teil der senilen Plaques nachgewiesen werden konnte (Yoshimoto et al., *Proc. Natl. Acad. Sci* 92, 9141-5 [1995] und WO-9506407), und zudem die Tatsache, dass - wie oben erwähnt - etwa 70% der Alzheimer Erkrankten in verschiedenen Hirnarealen Lewy Bodies aufweisen, in denen sich ebenfalls Alpha-Synuclein findet (Eizo et al., *Neurosci. Lett.* 290(1), 41-4 [2000]). In einem transgenen Mausmodell erhöht Beta-Amyloid die Akkumulation und die Neurotoxizität

von Alpha-Synuclein (Masliah et al., *Proc. Natl. Acad. Sci* 98(21): 12245-50 [2001]). Zusätzlich könnte Alpha-Synuclein als synaptisches Protein eine wichtige Rolle bei der initialen synaptischen Degeneration spielen, und somit eine Schlüsselrolle in der Pathogenese einnehmen.

Derzeit stehen keinerlei kausal wirksame Therapien der Alzheimer'schen Erkrankung, der Lewy Body Demenz, der Parkinson'schen Erkrankung oder anderer neurodegenerativer Erkrankungen zur Verfügung. Eine Verhinderung der abnormen Proteinaggregation durch einen endogenen Faktor könnte somit einen ersten Schritt in diese Richtung darstellen. Da Alpha- und Beta-Synuclein zusätzlich mit verschiedenen endogenen Signaltransduktionskaskaden wie der Proteinkinase C, oder der Phospholipase D2 und verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagieren, wären über diese Wirkwege zusätzliche positive Einflüsse, die sich neuroprotektiv auswirken könnten, denkbar.

Die Verwendung von Beta-Synuclein und insbesondere davon abgeleiteten Peptiden in Zusammenhang mit Alpha-Synuclein ist bekannt (siehe etwa Oktapeptide in WO 02/04482 und drei weitere Peptide in WO 02/04625). Die WO 002/0020 und WO 01/60794 beschreiben die Verwendung von Beta-Synuclein als ganzes Molekül bzw. von Methoden, die dessen Expression in vivo steigern zur Therapie von neurologischen Erkrankungen, die mit Alpha-Synuclein in Zusammenhang stehen. Die WO 01/60794 lehrt insbesondere auch die Verwendung eines Peptides mit der Aminosäure-Sequenz MDVFMKGLSMAKEGV, welches den N-terminalen Aminosäuren 1 bis 15 des Beta-Synucleins entspricht, zur Behinderung der Bindung von Alpha-Synuclein und Beta-Amyloid. Die WO 01/60794 liefert jedoch keinen Nachweis für eine tatsächliche protektive Wirkung dieses Peptides auf lebende, neuronale Zellen und enthält keine Hinweise auf andere wirksame Peptide in diesem Sequenzbereich. Kürzere Peptide wären jedoch für den Einsatz als Arzneimittel sehr vorteilhaft, da sich im Allgemeinen mit abnehmender Kettenlänge die Probleme der chemischen und biologischen Stabilität sowie der Bioverfügbarkeit stark vermindern.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, Peptide vorzustellen, die von der N-terminalen Sequenz des Beta-Synucleins abgeleitet sind und den Einfluß toxischer oder vitalitätsschädigender Noxen, wie sie bei neurodegenerativen Erkrankungen vorliegen, antagonisieren.

Gelöst wurde diese Aufgabe mit den in Anspruch 1 genannten Peptiden.

Überraschenderweise ergab sich die aus dem Stand der Wissenschaft

und Technik nicht ableitbare Tatsache, dass bereits einzelne Peptide, die nur die Hälfte bzw. sogar nur ein Drittel der in WO-0160794 beschriebenen Sequenz aus 15 Aminosäuren umfassen, in Modellen von pathologischen Vorgängen, wie sie bei neurodegenerativen Erkrankungen vorliegen oder vermutet werden, ausgezeichnete Wirkung entfalten; so etwa das Heptapeptid SMAKEGV und das Pentapeptid LSMAK.

Im Rahmen der Erfindung sind nicht nur Peptide, deren Einzelbestandteile l-Aminosäuren sind, sondern auch Peptide, deren Einzelbestandteile d-Aminosäuren sind.

Ebenso im Rahmen der Erfindung in Betracht gezogen sind N- oder C-terminal veränderte Peptide.

Die Peptide der Erfindung können auf verschiedene Weise synthetisch hergestellt werden.

Die chemische Synthese eines Peptids stellt ein konventionelles Verfahren dar und kann zum Beispiel durch die Merrifield Solid Phasen Synthesetechnik erreicht werden (Merrifield, J., *Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 [1963]; Kent et al., *Synthetic Peptides in Biology and Medicine*, 29 ff eds. Alitalo et al., Elsevier Science Publishers 1985; Haug, J.D. *Peptide Synthesis and the protecting group strategy*, *American Biotechnology Laboratory*, 5 (1):40-47 [1987]). Verfahren der chemischen Peptidsynthese beinhalten auch die Verwendung automatischer Peptidsynthetizer unter Verwendung kommerziell erhältlicher geschützter Aminosäuren wie zum Beispiel Biosearch (Modell 9500 und 9600), Applied Biosystems, Inc. (Modell 430; Miligen (Modell 9050) und andere. Zusätzlich zu den chemischen Verfahren können diese Peptide mittels rekombinanter Technologie in Zellen von Bakterien, Pilzen oder von Säugetieren hergestellt und mittels herkömmlicher Verfahren gereinigt werden.

Unabhängig davon, ob die Synthese der erfindungsgemäßen Peptide über chemische Wege oder durch rekombinante Technologien durchgeführt wird, kann es insbesondere zur Erhöhung der Stabilität nach Einführung in den zu therapierenden Organismus wünschenswert sein, die Peptide zu modifizieren. Dazu können beispielsweise folgende Methoden angewendet werden:

- 1) Kovalente Modifikationen, bei denen vorherbestimmte Aminosäure-Reste des Peptids mit organischen Derivatisierungssubstanzen an ausgewählten Seitenketten oder endständigen Resten reagieren können. Zum Beispiel reagieren Cysteinyl

Reste mit Alpha-Haloacetaten und korrespondierenden Aminen wie der Chloroessigsäure oder dem Chloroacetamid und ergeben dabei Carboxymethyl oder Carboxyamidomethyl Derivate. Cysteinyl Reste können auch durch die Reaktion mit Bromotrifluoroacetone, Alpha-Bromo-Beta (5-Imidozoyl) Propionsäure, Chloroacetylphosphat, N-Alkylmalemiden, 3-Nitro-2-Pyridyldisulfid, Methyl-2-Pyridyldisulfid, p-Chloromerkuribenzoat, 2-Chloromerkuri-4-Nitrophenol oder Chloro-7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-Diazol derivatisiert werden. Auch die Aminosäure Histidin kann leicht durch die Reaktion mit Diethylprocarbonat bei einem pH Wert von 5,5 - 7 derivatisiert werden, da diese Substanz relativ spezifisch für die Histidyl Seitenkette ist. Parabromophenazylbromid ist ebenfalls eine Möglichkeit, wobei die Reaktion vorzugsweise in 0,1 molaren Natriumcacodylate bei pH 6,0 ausgeführt wird.

- 2) Lysin und aminoterminal Reste können auch mit Succinat oder anderen Carboxylsäure-Anhydriden derivatisiert werden. Die Reaktion mit diesen Agenzien hat den Effekt, die Ladung des Lysinyl Restes umzukehren. Andere geeignete Reagenzien zur Derivatisierung Alphaamino enthaltender Reste inkludieren Imido-Ester wie Methyl-Bicollinimidat, Pyridoxal-Phosphat, Pyridoxal, Chloroborohydrid, Trinitrobenzensulfonsäure, O-Methyl Isoharnstoff, 2, 4 Pentandion und Transaminase katalysierte Reaktionen mit Glyoxylat. Die Arginyl Reste können durch die Reaktion mit einer oder mehreren konventionellen Reagenzien wie Phenylglyoxal, 2,3 Butandion, 1,2-Cyclohexandion und Ninhydrin modifiziert werden. Die Derivatisierung der Arginyl Reste erfordert, dass die Reaktion unter alkalischen Bedingungen wegen des hohen PK Wertes der Guanidin Gruppe durchgeführt wird. Zusätzlich können diese Reagenzien auch mit Gruppen des Lysin, sowie mit der Arginin-Epsilon Aminogruppe reagieren.
- 3) Tyrosyl Reste sind bekannte Targets für die Einführung von spektralen Markierungen durch die Reaktion mit aromatischen Diazonium Substanzen oder Tetranitromethan. Am häufigsten werden N-Acetylimidazol und Tetranitromethan verwendet, um O-Acetyltyrosil und 3-Nitroderivate zu produzieren.
- 4) Die Carboxyl Seitengruppe (Aspartyl oder Glutamyl) wird selektiv durch Reaktion mit Carbodimiden ($R'-N-C-N-R'$) wie 1-

Cyclohexyl-3-(2-Morpholinyl(4-Ethyl)) Carbodiimid oder 1-Ethyl-3-(4-Azonia-4,4-Dimethylpentyl)-Carbodiimidmodifiziert. Aspartyl und Glutamyl Reste werden durch die Reaktion mit Ammonium Ionen in Asparaginyll und Glutaminyl Reste verwandelt. Glutaminyl und Asparaginyll Reste werden häufig zu den entsprechenden Glutamyl und Aspartyl Resten deamidiert.

- 5) Andere Modifizierungen beinhalten die Hydroxylierung von Prolin und Lysin, die Phosphorylierung der Hydroxylgruppen von Seryl und Threonyll Resten, die Methylierung der Alpha Aminogruppe von Lysin, Argenin und Histidin Seitenketten, sowie die Acetylierung der N-terminalen Aminogruppe und die Amidierung der C-terminalen Carboxylgruppen.

Solche Derivatisierungen können dazu dienen, die Löslichkeit, Absorption, die biologische Halbwertszeit und ähnliches zu verbessern. Die Derivatisierungen könnten alternativ auch dazu dienen, etwaige ungewünschte Nebeneffekte der Proteine zu minimieren.

Bestimmung der biologischen Aktivität:

Da die Zielrichtung der Therapie mit den erfindungsgemäß vorgestellten Peptiden verschiedene neurodegenerative Erkrankungen sind, wurden unterschiedliche Modellsysteme für den Nachweis der biologischen Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Peptide bei neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt. In der Folge werden die einzelnen verwendeten Modellsysteme und die damit erzielten Ergebnisse beschrieben.

Gemeinsam ist diesen biologischen Testsystemen, daß aus Hühnerembryonen gewonnene kortikale Neuronen acht Tage in Kulturplatten kultiviert und sodann einer spezifischen Noxe ausgesetzt werden (Pettmann et al., *Nature* 281(5730): 378-80 [1979]).

Dazu werden einen Tag alte, befruchtete Hühnereier bei $+12 \pm 0,1$ °C und 80 \pm 5% Luftfeuchte acht Tage lang inkubiert. Am embryonalen Tag 0 werden die Eier in einen Bebrütungsinkubator transferiert und bis zum embryonalen Tag 8 bei $38 \pm 0,5$ °C und 55 \pm 5% inkubiert. Nach Entnahme der Gehirne werden die Kortices isoliert, homogenisiert und Neuronen in Primärkultur genommen (Kulturbedingungen: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 20% v/v fötales Kälberserum, 0,01% Gentamycin, 1 g/l Glukose, 2 mM L-Glutamin, $+37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte). Nach 8 Tagen in Kultur wird das zu prüfende Peptid zugesetzt (Endkonzentrationen von 1,56 bis 200 μM) und die spezifizierte Noxe

ausgeführt. Bei jedem Versuch wird eine geschädigte Kontrolle und eine Vehikel-Kontrolle mitgeführt. Nach Ablauf der spezifizierten Stressperiode wird der Anteil der noch lebenden Neuronen mit einem metabolischen kolorimetrischen Assay bestimmt (die Umsetzung des gelben Chromophors MTT zu einem blauen Formazan-Produkt erfolgt nur durch lebende Zellen).

Zu den Aminosäure-Sequenzen der zitierten Peptide siehe Tabelle 1.

Beispiel 1: Serum-Entzugsassay

Durch den Entzug von Wachstumsfaktoren (Reduktion der Zumischung von fötalem Kälberserum auf 2% v/v) wird ein langsamer und progredienter Zelltod durch Apoptose und Neurodegeneration herbeigeführt. Dies simuliert die Störungen in der Stimulation der Neuronen mit Nervenwachstumsfaktoren, die als eine der möglichen Ursachen neurodegenerativer Erkrankungen angenommen werden. Die Wirksamkeit der neuen Peptide in der Verhinderung des Zelltods wurden gemessen.

Insgesamt hatten in diesem Test 31 von 45 getesteten Peptidfragmente neuroprotektives, anti-apoptotisches Potential. Besonders effizient waren dabei die Substanzen BH#16 und BH#37 deren Effekte 150% über den Effekten der Kontrolle (=100%) lagen. Beim Oktapeptid BH#7 (Sequenz LSMKEGV) lagen die Effekte bei 450%.

Beispiel 2: Chronische Störung des Kalzium Stoffwechsels durch Ionomycin

Es wird vermutet, dass es bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen aufgrund metabolischer Fehlfunktionen zu einer chronischen Kalziumüberladung kommt, die über die Aktivierung verschiedener Enzymsysteme letztendlich Zelltod bewirkt. Bei dem vorliegenden Modell wird diese Schädigung durch eine Zugabe von Ionomycin in methanolischer Lösung (Endkonzentration: 10 μ M) über 24 Stunden hinweg induziert. Methanol, in Medium verdünnt, dient als Vehikel-Kontrolle.

In diesem ischämischen Schädigungsmodell waren 6 Substanzen neuroprotektiv wirksam. Interessant sind vor allem 3 Substanzen: BH#8, BH#13 und BH#34 führten zu einer Steigerung der Zellvitalität auf ca. 150%.

Beispiel 3: Oxidativer Stress durch Eisenchlorid

Langdauernde Behandlung mit Eisenchlorid stellt einen chronischen oxidativen Stress dar, der Nervenzellen, aber auch andere Zellen, zum Absterben bringt. Da Störungen im Eisenhaushalt sowohl für den Morbus Alzheimer als auch für den Morbus Parkinson, insbesondere aber bei Eisenspeichererkrankungen wie der Hallervorden-Spatz Erkrankung, beschrieben werden, stellt dieses Modell ein relevantes Testsystem dar. Am 8. Kulturtag werden Nervenzellen durch Zugabe von 10 μ l FeCl₂-Lösung geschädigt (Endkonzentration: 1mM). Geschädigt wird für 24 Stunden.

In diesem Assay wiesen 23 Peptidfragmente eine eindeutige neuroprotektive Wirkung auf, davon lag bei mehr als der Hälfte der Substanzen eine Steigerung der Vitalität auf über 150% vor. Mehr Substanzen als in jedem anderen Schädigungsassay führten zu einer Zellvitalitätssteigerung auf über 200% (BH#8, BH#10, BH#11, BH#13) bzw. 250% (BH#15, BH#6, BH#27, BH#28).

Beispiel 4: Oxidativer Stress durch Wasserstoffsuperoxyd

Durch die Zugabe von Wasserstoffsuperoxyd zum Kulturmedium werden freie Radikale erzeugt, die in Nervenzellkulturen massiven Zelltod bewirken. Da dies einen ubiquitären Mechanismus der Zellschädigung darstellt, hat dieses Modell sowohl für akute als auch chronische Nervendegeneration Relevanz. Am 8. Kulturtag wird den Nervenzellkulturen H₂O₂ zu einer Endkonzentration von 100 μ M zugesetzt.

Insgesamt 30 Peptide zeigten hier neuroprotektives Potential. Mit Effekten von über 200% verglichen mit der geschädigten Kontrolle (= 100%) waren die Substanzen BH#5, BH#8, BH#9 und BH#29 besonders auffallend. Eine neuronale Vitalitätssteigerung auf 145% und mehr zeigten auch die Peptide BH#13, BH#29, BH#37, BH#38 und BH#46.

Beispiel 5: Amyloid-Beta Aggregations Assay

Beta-Amyloid - Peptide stellen in aggregierter Form ein potentes Neurotoxin dar, dessen Zugabe zu Nervenzellkulturen zu einem raschen und fortschreitenden Zelltod führt. Da Beta-Amyloid Peptide eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer darstellen, ist dieses Modell als besonders relevant anzusehen.

Bei dem vorliegenden biologischen Test handelt es sich um ein speziell für dieses Projekt entwickeltes Verfahren zur Testung anti-

aggregatorischen Substanzpotentials. Die neu synthetisierten Peptide werden direkt einer frischen Lösung von Amyloid-Beta Peptiden zugegeben, um die Bildung neurotoxischer Aggregate zu verhindern. Die Auswirkung dennoch entstehender Aggregate auf das Wachstum und Überleben von Nervenzellkulturen ist der Meßparameter.

Sechs der getesteten 45 Peptidfragmente konnten die neurotoxische Wirkung von β -Amyloid₂₅₋₃₅ teilweise kompensieren. Auffallend sind die Peptide BH#24 und BH#26, die zu einer Steigerung der neuronalen Vitalität um 44 bzw. 74% führen. Allerdings konnten andere Peptide, deren Synthese schwierig war oder weil nur wenig Material verfügbar war, nur einmal getestet werden. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass das eine oder andere Peptid ebenfalls wirkungsvoll sein könnte.

Beispiel 6: Zytotoxische Wirkung von prä-aggregiertem Beta-Amyloid Peptid

Im Gegensatz zum zuvor geschilderten Test arbeitet dieser mit präformierten neurotoxischen Amyloid-Aggregaten. Um diese zu erzeugen, wird ein aus den Aminosäuren 25 bis 35 bestehendes Beta-Amyloidpeptid (β -A₍₂₅₋₃₅₎) in phosphatgepuffertem Kochsaz gelöst (1 mM) und für mindestens 72 Stunden zur Komplexbildung bei Raumtemperatur gelagert. Am 8. Kulturtag wird diese Lösung in einer Endkonzentration von 20 μ M in die Kulturen pipettiert und nach 24 Stunden Exposition wird wie üblich der Anteil der lebenden Zellen bestimmt.

21 von 45 untersuchten Peptiden zeigten neuroprotektives Potential. Die Effekte lagen zwischen 120 und 150% gegenüber der ungeschädigten Vehikel-Kontrolle, wobei teilweise Effekte bereits in sehr niedrigen Dosierungen erkennbar sind.

Bis auf den Aggregationsassay (Beispiel Nr. 5), für den nur ein Versuchsdurchgang stattfand, sind in allen Abbildungen der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (Stabw) von zumindest zwei unabhängigen Experimenten ($n > 6$) dargestellt. D.h. die Durchführung der Versuche erfolgte an unterschiedlichen Tagen mit unterschiedlichen Zellpräparationen und von verschiedenen Personen. Für einige Peptide wurden zwei Nummern vergeben (#1=#23 oder #6=#35 oder #7=#43), die Ergebnisse mit diesen Peptiden wurden aber nur einmal dargestellt. Ein Peptid konnte nicht getestet werden, da es nicht in Lösung gebracht werden konnte (#49). Mit einigen anderen Substanzen gab es Probleme bei

010616

10

der Herstellung, weshalb nur geringe Mengen verfügbar waren und die Substanzen nicht in allen Assays ausgetestet werden konnten (#12, 14, 17, 35 und #48). Generell waren nur wenige Peptide in keinem Assay wirksam (, 18, , 32, , 41,). In nur einem Screening Assay wirksam waren die Peptide mit der Nummer # 12, 20, 30, 33, 39 und 45,. Wie aus den Abbildungen ersichtlich, sind die Standardabweichungen, d.h. die Schwankungen zwischen den unabhängigen Experimenten, teilweise recht groß. Diese Schwankungen sind auf Stabilitätsprobleme zurückzuführen.

Tabelle 1:

Aminosäure-Sequenzen der getesteten Beta-Synuclein - Peptide und ihre Resultate in den biologischen Testsystemen der Beispiele 1 bis 6

Code	AA-Sequenc	# AA	2%Assay (% viability)	lonomycl n (% viability)	FeCl2 (% viability)	H2O2 (% viability)	β -Amyl (% viability)	A β P reag g. (diff vs C) 23%
BH#1	DVFMKGLSMAKEGV	14	132 \pm 28,6		125 \pm 51,3			
BH#2	VFMKGLSMAKEGV	13		133 \pm 6,2	184 \pm 119,5	140 \pm 33,2		
BH#3	FMKGLSMAKEGV	12	148 \pm 59,2		144 \pm 77,7			
BH#4	MKGLSMAKEGV	11	155 \pm 16,2		148 \pm 31,3		151 \pm 31,1	
BH#5	KGLSMAKEGV	10	143 \pm 52,4	137 \pm 18,4	145 \pm 70,0			
BH#6	GLSMAKEGV	9			153 \pm 71,5	130 \pm 30,0	120 \pm 11,2	
BH#7	LSMAKEGV	8			183 \pm 113,7	122 \pm 22,9	124 \pm 12,3	
BH#8	SMAKEGV	7	139 \pm 29,6	156 \pm 19,4				23%
BH#9	MAKEGV	6			123 \pm 81,0			
BH#10	AKEGV	5	139 \pm 34,8					
BH#11	KEGV	4				132 \pm 50,0	131 \pm 11,4	
BH#12	MDVFMKGLSMAKEG	14	156 \pm 82,9	X				
BH#13	MDVFMKGLSMAKE	13	166 \pm 11,1			151 \pm 54,2	129 \pm 14,0	
BH#14	MDVFMKGLSMAK	12	122 \pm 26,9	X	X	X	X	
BH#15	MDVFMKGLSMA	11	149 \pm 49,8			126 \pm 28,0		
BH#16	MDVFMKGLSM	10				144 \pm 20,4	132 \pm 44,6	
BH#17	MDVFMKGLS	9	169 \pm 103,1	124 \pm 7,3	150 \pm 116,8	X	144 \pm 26,7	
BH#18	MDVFMKGL	8						
BH#19	MDVFMKG	7			131 \pm 33,6	127 \pm 32,1	132 \pm 14,9	20%
BH#20	MDVFMK	6			132 \pm 38,7			
BH#21	MDVFM	5	151 \pm 68,8			126 \pm 10,3	137 \pm 33,0	
BH#22	MDVF	4	189 \pm 103,1		140 \pm 38,0		120 \pm 10,8	
BH#24	DVFMKGLSMAKEG	13	125 \pm 19,0				122 \pm 3,0	
BH#25	DVFMKGLSMAKE	12	169 \pm 43,8				148 \pm 21,0	
BH#26	DVFMKGLSMAK	11						
BH#27	DVFMKGLSMA	10				147 \pm 7,9	128 \pm 14,6	
BH#28	DVFMKGLSM	9				130 \pm 77,3	144 \pm 8,6	
BH#29	DVFMKGLS	8			157 \pm 22,1	154 \pm 42,7		
BH#30	DVFMKGL	7					126 \pm 32,0	
BH#31	DVFMKG	6			138 \pm 47,5	124 \pm 37,6	143 \pm 55,9	
BH#32	DVFMK	5						
BH#33	DVFM	4					145 \pm 20,9	
BH#34	DVF	3					136 \pm 13,4	19%
BH#36	GLSMAKEG	8	183 \pm 14,9		125 \pm 26,6		134 \pm 23,9	
BH#37	GLSMAKE	7				144 \pm 32,5		
BH#38	GLSMAK	6	172 \pm 74,4		152 \pm 72,8	147 \pm 14,3		
BH#39	GLSMA	5						
BH#40	GLSM	4	164 \pm 72,5		144 \pm 30,4			
BH#41	GLS	3						
BH#42	GL	2		120,0 \pm 16,4			128 \pm 18,4	
BH#44	LSMAKEG	7	183 \pm 97,1	121,0 \pm 28,0				
BH#45	LSMAKE	6	148 \pm 53,4					
BH#46	LSMAK	5				147 \pm 22,0		
BH#47	LSMA	4				135 \pm 7,5		
BH#48	LSM	3		120 \pm 15,4			120 \pm 26,5	

Die nachfolgende Tabelle 2 fasst die Charakteristiken der wichtigsten Substanzen aus diesem Screening zusammen. Bei diesen Peptiden handelt es sich um die im Rahmen der Erfindung bevorzugten Peptide.

Tabelle 2:

Zusammenfassende Darstellung der hinsichtlich ihrer neuroprotektiven Wirkung auffälligsten Beta-Synuclein - Peptide

Code	AA-Sequenz:	AA	Wirksam in:	Bemerkungen
BH#8	SMAKEGV	7	5 von 7 assays	kleines Peptid, extrem hohe Effekte, in sehr vielen Assays wirksam, therapeutisch interessant
BH#13	MDVFMKGLSMAKE	13	5 von 7 assays	in sehr vielen Assays wirksam
BH#16	MDVFMKGLSM	10	4 von 7 assays	in sehr vielen Assays wirksam
BH#26	DVFMKGLSMAK	11	2 von 7 assays	als Gruppe besonders interessant, weil von der Aminosäuresequenz sehr ähnlich, sehr hohe Effekte
BH#27	DVFMKGLSMA	10	4 von 7 assays	
BH#28	DVFMKGLSM	9	4 von 7 assays	
BH#46	LSMAK	5	2 von 7 assays	hohe Effekte, kleinstes Peptid, therapeutisch interessant

In der Beschreibung, den Ansprüchen und in den Tabellen 1 und 2 steht

A für d- oder l-Alanin,
D für d- oder l-Asparaginsäure,
E für d- oder l-Gentaminsäure,
F für d- oder l-Phenylsäure,
G für d- oder l-Glycin,
K für d- oder l-Lysin,
L für d- oder l-Leucin,
M für d- oder l-Methonin,
S für d- oder l-Serin und
V für d- oder l-Valin.

Dosierungen und Verabreichungsformen:

Im Allgemeinen werden die erfindungsgemäßen Verbindungen in therapeutisch effektiven Mengen in pharmazeutisch akzeptablen Trägern oder Lösungsmitteln verabreicht. Solche Träger inkludieren (sind aber nicht beschränkt auf) physiologische Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose, Wasser, Glycerin, Ethanol und Kombinationen

daraus. Die jeweilige Formulierung soll an die Art der Verabreichung angepasst sein.

Die Zusammensetzung kann wenn nötig auch unterschiedliche Mengen von Feuchtespendern oder Emulgatoren oder pH-puffernden Substanzen enthalten. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann eine flüssige Lösung sein, eine Suspension, eine Emulsion, eine Tablette, eine Pille, eine Kapsel, eine Retard-Formulierung oder ein Pulver. Die Zubereitung kann auch als Suppositorium mit traditionellen Bindemitteln und Trägersubstanzen wie Triglyzeriden hergestellt werden. Orale Formulierungen können Standardträger wie Mannitol, Laktose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsacharin, Zellulose, Magnesiumcarbonat und andere in pharmazeutischem Reinheitsgrad enthalten. Verschiedene Verabreichungssysteme sind bekannt und können verwendet werden, um die therapeutische Anwendung der erfindungsgemäßen Substanzen zu gewährleisten, wie z.B. die Verkapselung in Liposomen, Mikropartikeln, Mikro kapseln u.ä..

Die Verabreichungsform wird in Übereinstimmung mit routinemäßigen Verfahren als pharmazeutische Verabreichungsform adaptiert für intravenöse Administration an Menschen oder anderen Säugetieren zubereitet. Typischerweise sind die Zusammensetzungen für die intravenöse Verabreichung Lösungen in steriler isotonischer wässriger Pufferlösung. Wenn notwendig, kann die Zubereitung auch Lösungsvermittler und lokal wirksame Anästhetika enthalten, um den Schmerz an der Injektionsstelle zu lindern.

Im Allgemeinen werden die Bestandteile entweder separat oder vermischt in einer Dosierungseinheit zur Verfügung gestellt. Zum Beispiel als trockenes lyophilisiertes Pulver oder wasserfreies Konzentrat in einem hermetisch versiegelten Container wie einer Ampulle, an der die Menge des aktiven Pharmakons vermerkt ist.

Wenn die Darreichungsform als Infusion verabreicht werden muss, kann sie in einer Infusionsflasche, die steriles Wasser oder Salzlösung in pharmazeutischem Reinheitsgrad enthält, aufgelöst werden. Wenn immer die Zubereitung durch Injektion verabreicht wird, kann eine Ampulle mit sterilem Wasser für Injektionszwecke oder Kochsalzlösung so zur Verfügung gestellt werden, dass die Einzelbestandteile vor der Administration bestimmungsgerecht vermischt werden können.

Die therapeutischen Substanzen, die in der Erfindung beschrieben werden, können sowohl als neutrale Form, als auch als Salz formuliert werden. Pharmazeutisch akzeptierbare Salze inkludieren solche, die mit den freien Aminogruppen gebildet wurden, z.B. jene, die von der

Salzsäure oder der Oxalsäure stammen und solche, die mit freien Carboxylgruppen, wie jene abgeleitet von Natrium, Kalium, Ammonium, Calcium, Eisenoxiden, Isopropylamin, Triethylamin, 2-Ethylaminoethanol, Histidin, Procain und anderen gebildet werden.

Die Menge des Therapeutikums, das in der Erfindung beschrieben wird, muss für die Behandlung der speziellen Erkrankung oder des Zustands effektiv sein, wird von der Natur der Erkrankung bzw. des Zustands abhängen und durch standardisierte klinische Verfahren bestimmt. Die genaue Dosis, die in der Erfindung angewendet werden muss, hängt auch von der Art der Verabreichung und dem Schweregrad der Erkrankung oder der Störung ab, und diese Menge sollte nach Einschätzung des erfahrenen Arztes unter Berücksichtigung der spezifischen Patientenumstände angepasst werden. Geeignete Dosierungsbereiche für die intravenöse Verabreichung liegen im Allgemeinen zwischen 20 - 4.000 μ g des aktiven Bestandteils pro kg Körpergewicht. Geeignete Dosierungen für intranasale Anwendungen liegen im Bereich zwischen 0,01 μ g pro kg Körpergewicht bis zu 1mg pro kg Körpergewicht. Effektive Dosierungen für orale Anwendungen liegen im Bereich von 1mg bis 1.000mg pro kg Körpergewicht und Tag. Die effektiven Dosierungen werden von Dosiswirkungskurven, die aus *in vitro* Modellen oder Tiermodelltestsystemen abgeleitet werden, extrapoliert.

2002.03.28

JSW-Research Forschungslabor GmbH
vertreten durch:

Zusammenfassung:

Beschrieben werden neue Peptide, deren Einzelbestandteile l-Aminosäuren oder d-Aminosäuren sind. Diese Peptide kommen als Wirkstoffe in Arzneimitteln zur Anwendung bei der Therapie von Erkrankungen, bei denen das vermehrte Auftreten von freien Radikalen eine pathophysiologische Rolle spielt, oder bei der Therapie von Erkrankungen mit akuter Hypoxie oder Ischämie in einem Organsystem des Körpers, insbesondere im Zentralnervensystem, oder bei der Therapie von Eisenspeichererkrankungen, wie der Hallervorden-Spatz'schen Erkrankung, oder bei der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere der Alzheimer'schen Erkrankung, der Lewy Body Variante der Alzheimer'schen Erkrankung, der Parkinson'schen Erkrankung, der Multisystem Atrophie, der Lewy Body Demenz oder der Huntington's Chorea, und allen diesen neurodegenerativen Erkrankungen ähnlichen Zustandsbildern.

010518

BETHA-FAHNDLER
PATE...
1070 WI...

2002.03.28 Doppel
M157-3000-pAT
B/St

A 495 / 2002

JSW-Research Forschungslabor GmbH
in Graz, AT

Urtext

Patentansprüche:

1. Neues Peptid, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

DVFMKGLSMAKEGV

VFMKGLSMAKEGV

FMKGLSMAKEGV

MKGLSMAKEGV

KGLSMAKEGV

GLSMAKEGV

LSMAKEGV

SMAKEGV

MAKEGV

AKEGV

KEGV

MDVFMKGLSMAKEG

MDVFMKGLSMAKE

MDVFMKGLSMAK

MDVFMKGLSMA

MDVFMKGLSM

MDVFMKGLS

MDVFMKGL

MDVFMKG

MDVFMK

MDVFM

MDVF

DVFMKGLSMAKEG

DVFMKGLSMAKE

DVFMKGLSMAK

DVFMKGLSMA

DVFMKGLSM

DVFMKGLS

DVFMKGL

DVFMKG

DVFMK

DVFM

DVF

GLSMAKEG

010815

GLSMAKE

GLSMAK

GLSMA

GLSM

GLS

GL

LSMAKEG

LSMAKE

LSMAK

LSMA

LSM

LS

2. Peptide nach Anspruch 1, wobei die Einzelbestandteile 1-Aminosäuren sind.

3. Peptide nach Anspruch 1, wobei die Einzelaminosäuren d-Aminosäuren sind.

4. Peptide nach Anspruch 1 oder 2, bei denen N-terminal die Aminosäure Prolin substituiert ist.

5. Peptide nach Anspruch 1 oder 2, bei denen C-terminal die Aminosäure Prolin substituiert ist.

6. Peptide nach Anspruch 1 oder 2, bei denen N-terminal und C-terminal die Aminosäure Prolin substituiert ist.

7. Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 6, die N-terminal acetyliert sind.

8. Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 7, die C-terminal amidiert sind.

9. Peptide nach Anspruch 7 oder 8, die N-terminal acetyliert und C-terminal amidiert sind.

10. Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure Valin (V) durch die Aminosäure Prolin (P) ersetzt ist.

11. Arzneimittel zur Anwendung bei der Therapie von Erkrankungen, bei denen das vermehrte Auftreten von freien Radikalen eine pathophysiologische Rolle spielt, gekennzeichnet durch wenigstens ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

12. Arzneimittel zur Anwendung bei der Therapie von Erkrankungen mit akuter Hypoxie oder Ischämie in einem Organsystem des Körpers, insbesondere im Zentralnervensystem, gekennzeichnet durch wenigstens ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

13. Arzneimittel zur Anwendung bei der Therapie von Eisenspeichererkrankungen, wie der Hallervorden-Spatz'schen Erkrankung,

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.